

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-89499

⑬ Int. Cl.⁵
C 07 K 13/00

識別記号

庁内整理番号

7731-4H
8717-4B

⑭ 公開 平成4年(1992)3月23日

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全14頁)

⑮ 発明の名称 ヒト肝実質細胞増殖因子

⑯ 特 願 平2-200898

⑰ 出 願 平2(1990)7月27日

⑱ 発 明 者 喜 多 村 直 実 大阪府守口市八雲東町2丁目272番地
⑱ 発 明 者 仲 大 地 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内
⑱ 発 明 者 松 井 理 恵 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内
⑱ 発 明 者 芳 山 美 子 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内
⑲ 出 願 人 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号
⑳ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

ヒト肝実質細胞増殖因子

2 特許請求の範囲

(1) 下記アミノ酸配列(配列中、Xaaはピログルタミン酸を要す。)で表わされるヒト肝実質細胞増殖因子。

Xaa Arg Lys Arg Arg
Asn Thr Ile His Glu
Phe Lys Lys Ser Ala
Lys Thr Thr Leu Ile
Lys Ile Asp Pro Ala
Leu Lys Ile Lys Thr
Lys Lys Val Asn Thr
Ala Asp Gln Cys Ala
Asn Arg Cys Thr Arg
Asn Lys Gly Leu Pro
Phe Thr Cys Lys Ala
Phe Val Phe Asp Lys
Ala Arg Lys Gln Cys

Leu Trp Phe Pro Phe
Asn Ser Met Ser Ser
Gly Val Lys Lys Glu
Phe Gly His Glu Phe
Asp Leu Tyr Glu Asn
Lys Asp Tyr Ile Arg
Asn Cys Ile Ile Gly
Lys Gly Arg Ser Tyr
Lys Gly Thr Val Ser
Ile Thr Lys Ser Gly
Ile Lys Cys Gln Pro
Trp Ser Ser Met Ile
Pro His Glu His Ser
Phe Leu Pro Ser Ser
Tyr Arg Gly Lys Asp
Leu Gln Glu Asn Tyr
Cys Arg Asn Pro Arg
Gly Glu Glu Gly Gly
Pro Trp Cys Phe Thr
Ser Asn Pro Glu Val

Arg Tyr Glu Val Cys
 Asp Ile Pro Gln Cys
 Ser Glu Val Glu Cys
 Met Thr Cys Asn Gly
 Glu Ser Tyr Arg Gly
 Leu Met Asp His Thr
 Glu Ser Gly Lys Ile
 Cys Gln Arg Trp Asp
 His Gln Thr Pro His
 Arg His Lys Phe Leu
 Pro Glu Arg Tyr Pro
 Asp Lys Gly Phe Asp
 Asp Asn Tyr Cys Arg
 Asn Pro Asp Gly Gln
 Pro Arg Pro Trp Cys
 Tyr Thr Leu Asp Pro
 His Thr Arg Trp Glu
 Tyr Cys Ala Tyr Lys
 Thr Cys Ala Asp Asn
 Thr Met Asn Asp Thr

Asp Val Pro Leu Glu
 Thr Thr Glu Cys Ile
 Gln Gly Gln Gly Ile
 Gly Tyr Arg Gly Thr
 Val Asn Thr Ile Trp
 Asn Gly Ile Pro Cys
 Gln Arg Trp Asp Ser
 Gln Tyr Pro His Glu
 His Asp Met Thr Pro
 Glu Asn Phe Lys Cys
 Lys Asp Leu Arg Glu
 Asn Tyr Cys Arg Asn
 Pro Asp Gly Ser Glu
 Ser Pro Trp Cys Phe
 Thr Thr Asp Pro Asn
 Ile Arg Val Gly Tyr
 Cys Ser Gln Ile Pro
 Asn Cys Asp Met Ser
 His Gly Gln Asp Cys
 Tyr Arg Gly Asn Gly

Lys Asn Tyr Met Gly
 Asn Leu Ser Gln Thr
 Arg Ser Gly Leu Thr
 Cys Ser Met Trp Asp
 Lys Asn Met Glu Asp
 Leu His Arg His Ile
 Phe Trp Glu Pro Asp
 Ala Ser Lys Leu Asn
 Glu Asn Tyr Cys Arg
 Asn Pro Asp Asp Asp
 Ala His Gly Pro Trp
 Cys Tyr Thr Gly Asn
 Pro Leu Ile Pro Trp
 Asp Tyr Cys Pro Ile
 Ser Arg Cys Glu Gly
 Asp Thr Thr Pro Thr
 Ile Val Asn Leu Asp
 His Pro Val Ile Ser
 Cys Ala Lys Thr Lys
 Gln Leu Arg Val Val

Asn Gly Ile Pro Thr
 Arg Thr Asn Ile Gly
 Trp Met Val Ser Leu
 Arg Tyr Arg Asn Lys
 His Ile Cys Gly Gly
 Ser Leu Ile Lys Glu
 Ser Trp Val Leu Thr
 Ala Arg Gln Cys Phe
 Pro Ser Arg Asp Leu
 Lys Asp Tyr Glu Ala
 Trp Leu Gly Ile His
 Asp Val His Gly Arg
 Gly Asp Glu Lys Cys
 Lys Gln Val Leu Asn
 Val Ser Gln Leu Val
 Tyr Gly Pro Glu Gly
 Ser Asp Leu Val Leu
 Met Lys Leu Ala Arg
 Pro Ala Val Leu Asp
 Asp Phe Val Ser Thr

Ile Asp Leu Pro Asn
 Tyr Gly Cys Thr Ile
 Pro Glu Lys Thr Ser
 Cys Ser Val Tyr Gly
 Trp Gly Tyr Thr Gly
 Leu Ile Asn Tyr Asp
 Gly Leu Leu Arg Val
 Ala His Leu Tyr Ile
 Met Gly Asn Glu Lys
 Cys Ser Gln His His
 Arg Gly Lys Val Thr
 Leu Asn Glu Ser Glu
 Ile Cys Ala Gly Ala
 Glu Lys Ile Gly Ser
 Gly Pro Cys Glu Gly
 Asp Tyr Gly Gly Pro
 Leu Val Cys Glu Gln
 His Lys Met Arg Met
 Val Leu Gly Val Ile
 Val Pro Gly Arg Gly

Cys Ala Ile Pro Asn
 Arg Pro Gly Ile Phe
 Val Arg Val Ala Tyr
 Tyr Ala Lys Trp Ile
 His Lys Ile Ile Leu
 Thr Tyr Lys Val Pro
 Gln Ser *

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はヒト肝実質細胞増殖因子に関する。

(従来の技術)

肝臓は、生体中唯一再生可能な臓器である。この肝再生現象は肝移植実験や体液交換実験などから何らかの複性因子によることが示唆されてきた。近年、本発明者らは肝実質細胞を生体内より取り出し生体外においてその増殖を促進させるヒト由来の蛋白性因子すなわち、ヒト肝実質細胞増殖因子(以下「hHGF」と略す。)を劇症肝炎患者血漿より見だし(バイオメディカルリサーチ(Biomed. Res.) 6巻231頁(19

85)及びエクスペリメンタルセルリサーチ(Exp. Cell. Res.) 166巻139頁(1986))、世界で初めて単一の蛋白質として精製することに成功した(特開昭63-22526号公報及びジャーナルオブクリニカルインベスティゲーション(J. Clin. Invest.) 81巻414頁(1988))。さらにhHGF蛋白質をコードする遺伝子を単離するに至った(特許出願済(特願平1-209449号)及びバイオケミカルバイオフィジカルリサーチコミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.) 163巻967頁(1989))。

このhHGF蛋白質はシグナル様ペプチド配列から数え、494個のアミノ酸からなるH鎖ペプチドと234個のアミノ酸からなるL鎖ペプチドより構成される蛋白質で少なくとも4箇所に糖鎖結合部位を持つことを特徴とする。これら2つのペプチド鎖はジスルフィド結合(S-S結合)により結合しており、肝実質細胞の増殖を生体外に

於いて促進する活性が認められている(バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Commun.) 163巻967頁(1989))。各ペプチド鎖の遺伝子はH鎖及びL鎖ペプチドの順に連なった形でコードされている。そのため一本のRNA上に転写され、同時に一つの蛋白質として翻訳される。その後N末端側に存在するシグナル様配列の切断除去が起こりさらにそれ以降の一本の蛋白質鎖が二本に切断される。これによって生じた二本のペプチド鎖はS-S結合を介して機能的な蛋白質を形成すると考えられる。(発明が解決しようとする問題点)

このhHGF蛋白質の生化学的ならびに生理的機能を明らかにすることは肝再生機構の解明のみならず、生体外における安定な肝実質細胞の供給ならびに肝疾患に対する治療法の開発に重要な役割を担ってくる。しかしながらhHGF蛋白質の生体における詳細な機能、あるいは肝障害時における肝再生に対するhHGF蛋白質の効果等を調

べるためには多量のhHGF蛋白質を必要とする。

ところが現在に至るまでhHGF蛋白質を取得する方法としては、劇症肝炎患者血漿を材料として、その中に微量に存在するhHGF蛋白質の精製を行わざるをえなかった。この方法は人的、時間的、價格的に必ずしも容易な方法ではなく、またウイルスなどを始めとした感染源の存在する患者血漿中から微量なhHGF蛋白質のみを安定にとりだすことは困難を極める。これらの理由から劇症肝炎患者血漿を材料としたhHGF蛋白質の安定かつ大量の精製は行われていなかった。

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは、hHGF蛋白質を組換えDNA技術により安定かつ大量に取得するため種々の検討をした結果、この目的に有用なhHGF蛋白質をコードする遺伝子を含む発現ベクターを新たに構築しhHGF蛋白質の発現を可能にした(特願平2-88592号公報)。

更に、本発明者らは、上記発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養して得られるhHGF

のアミノ酸配列について検討した結果、分泌されたhHGFのN末端アミノ酸がピログルタミン酸であることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、第2図で表わされるアミノ酸配列を有するヒト肝実質細胞増殖因子に存する。

以下に、本発明を説明する。

hHGF蛋白質の工業生産のためには、その蛋白質発現が安定した宿主-ベクター系を選択すること、さらに発現したhHGF蛋白質が生物学的活性すなわち肝実質細胞の増殖活性を有している必要がある。特に天然のhHGF蛋白質が糖蛋白質であること、またhHGF蛋白質が多くのシステイン残基を含み、そのシステイン残基間のチオール結合の位置および蛋白質の高次構造が活性維持に重要であることを考慮する必要がある。

このような場合、宿主としては酵母や大腸菌例えば、Saccharomyces cerevisiae株やEscherichia coli

上YA-21株等の微生物も使用することが出来るが、動物細胞例えばCHO細胞、COS細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞等を用いて上記遺伝子が発現させることが望ましい。またこれらの細胞を宿主とする場合は、第1図に示すDNA配列中に含まれるシグナル様配列すなわち1~93番目を含む未成熟のhHGF遺伝子を細胞内に導入することにより、成熟型hHGF蛋白質が細胞外に分泌生産されることが期待されるという利点が挙げられる。

本発明において用いられる発現ベクターは、そのプロモーター下流にhHGF蛋白質の一部または全部のアミノ酸配列をコードするDNA断片を有する。

プロモーターとしては、種々のプロモーターが報告されているが、本発明においては、SV40プロモーターまたはメタロチオネイン遺伝子のプロモーターが好ましい。このプロモーターの下流に前述のシグナル様配列を含む未成熟のhHGF遺伝子のDNA断片を転写方向に従って挿入する。

この場合、hHGF遺伝子のDNA断片をタンデムに2-3個結合したものを挿入してもよいし、また、hHGF遺伝子のDNA断片の5'上流側にプロモーターを結合したDNA断片を単位とし、転写方向を揃えてタンデムに2-3個結合したものを挿入してもよい。

上記hHGF遺伝子には、その下流にポリアダニル化部位が存在することが必要である。例えば、SV40 DNA、 β -グロビン遺伝子またはメタロチオネイン遺伝子由来のポリアダニル化部位がhHGF遺伝子の下流に1つ存在することが必要である。また、hHGF遺伝子にプロモーターを結合したDNA断片を2-3個タンデムに挿入する方法を用いた場合には、各hHGF遺伝子の3'側にそれぞれポリアダニル化部位を存在させることが可能である。

上記の発現ベクターを用いて動物細胞例えばCHO細胞を形質転換する際には、選択マーカーを用いることが望ましい。選択マーカー遺伝子を該発現ベクターのポリアダニル化部位下流に順方向

あるいは逆方向に挿入しておく、形質転換体を得る際に、選択マーカー遺伝子を含む別のプラスミドを二重形質転換する必要がない。このような選択マーカーとしては、メトトレキセート耐性を与えるDHFR遺伝子(ジャーナル・オブ・モレキュラ・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 159巻601頁(1982))、抗生物質G-418耐性を与えるNeo遺伝子(ジャーナル・オブ・モレキュラ・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.) 1巻327頁(1982))、ニコフェノール酸耐性を与える大腸菌由来のEco⁺遺伝子(プロシーディング・アンド・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 78巻2072頁(1981))、抗生物質ハイグロマイシン耐性を与えるhph遺伝子(モレキュラ・セル・バイオロジー(Mol. Cell. Biol.) 5巻410頁(1985))等が挙げられる。これらの各耐性遺伝子の5'上流側にはプロモーター、例

えば前述のSV40由来のプロモーターが挿入されており、また、各耐性遺伝子の3'下流側には、前述のポリアデニル化部位が含まれる。

発現ベクターに上記のような選択マーカー遺伝子が挿入されていない場合には、形質転換体の選択のマーカーを有するベクター例えばpSV2neo(ジャーナル・オブ・モレキュラ・アプライド・ジェネティクス(J. Mol. Appl. Genet.) 1巻327頁(1982))、pMBG(ネイチャー(Nature) 294巻228頁(1981))、pSV2gpt(プロシーディング・アンド・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Prec. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 78巻2072頁(1981))、pAd-D26-1(ジャーナル・オブ・モレキュラ・バイオロジー(J. Mol. Biol.) 159巻601頁(1982)) (J. Mol. Biol. 159, 601 (1982))などをhHGF遺伝子の発現ベクターと共に二重形質転換し、選択マーカー遺伝子の表現形質によ

り形質転換体を容易に選択できる。

以上のような方法で、選択されるhHGF蛋白質遺伝子を含む細胞について選択マーカーを変更して二重形質転換を繰り返すと、発現量が約20倍上昇するので好ましい。

発現ベクターの動物細胞への導入はリン酸カルシウム法(ビロロジー(Virology) 52巻456頁(1973))、エレクトロポレーション法(ジャーナル・オブ・メンブレン・バイオロジー(J. Membr. Biol.) 10巻279頁(1972))等が挙げられるが、リン酸カルシウム法が一般的である。

形質転換された動物細胞の培養は、常法により浮遊培養または附着培養で行うことができる。培地としては、MEM、RPMI 1640などを用い、5-10%の血清存在下もしくは適量のインシュリン、デキサメサゾン、トランスフェリンの存在下、もしくは無血清下にて培養する。

hHGF蛋白質を産生している動物細胞はその培養上清中に産生されたhHGF蛋白質を分泌す

ることから、この組織培養の培養上清を用いhHGF蛋白質の分離精製を行うことが可能である。具体的には生産されたhHGF蛋白質を含む培養上清を各種クロマトグラフィー、例えば、S-セファロース、ヘパリンセファロース、ハイドロキシアパタイトもしくは硫酸化セルロース等を組み合わせたクロマトグラフィーにて精製することにより、hHGF蛋白質を単離精製することができる。

本発明においては、第2図に示されるMetからはじまるプレhHGFがまず宿主内で発現される。次いで、宿主内で修飾を受けて第31番目のGlyと第32番目のGlnの間で加水分解されて31個のシグナルペプチドが切断される。次いで、N末端のGlnが脱アミノ化されてピログルタミン酸に変化したhHGFが分泌される。

かくして、本発明のN末端がピログルタミン酸に修飾されたhHGFが得られる。

(実施例)

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説

明するが、その要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1

(1) hHGF蛋白質発現プラスミドの調製

第3図にhHGF蛋白質発現プラスミドの調製方法を示す。hHGF cDNA (バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (B. B. R. C 第163巻 (2) 967頁-973頁 (1989)) を含む BamHI-KpnI 断片すなわちhHGF蛋白質翻訳開始点ATGより27塩基上流のBamHI切断点から終止コドンTAGより8塩基上流のKpnI切断点までの領域をカバーする約2.3kbのBamHI-KpnI断片を含むプラスミドpUCHGF1 DNAを常法 (「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、93頁 (1982)) により調製した。

次に該プラスミドDNA 10 μ gを常法に従い制限酵素KpnIで切断し、得られたDNA断片を常法に従いフェノール・クロロホルム抽出を行

い、エタノール沈澱により該DNA断片を精製し10 μ lの水に溶解した。

さらにこのDNA断片のKpnI切断点に第3図に示す両末端が制限酵素KpnI切断点をもちかつ内部に終止コドンTGA及び制限酵素BamHI切断点を含む32塩基の合成リンカーをManiatisらの方法 (「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、396頁-397頁 (1982)) に従い導入した。

これを用いて常法に従い大腸菌を形質転換し、得られた形質転換体よりプラスミドDNAを常法 (「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、93頁 (1982)) により調製した。

次に該プラスミドDNA 10 μ gを常法に従い制限酵素BamHIで切断し、この制限酵素反応液を1.0%アガロースゲルによって電気泳動をすることにより目的の開始コドンATGと終止コドンTGAを含むhHGF cDNA断片をベクター等

の目的以外のDNA断片と分離した。Maniatisらの方法 (「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、164頁 (1982)) に従いアガロースゲル断片から目的とするhHGF遺伝子をコードする約2.3kbのBamHI-BamHI DNA断片を調製した。得られたDNA断片の末端を常法に従いT4 DNAポリメラーゼにて平滑末端にした後フェノール・クロロホルム抽出を行い、エタノール沈澱により該DNA断片を精製し10 μ lの水に溶解した。

一方、発現ベクターpKCR (プロシーディング・アンド・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) 78巻1527頁 (1981)) 0.05 μ gは予め常法に従い平滑末端を生じる制限酵素SmaIで切断し、フェノール・クロロホルム抽出を行いエタノール沈澱により精製した。これを400 μ lの50 mM トリス-塩酸 (pH 8)、1 mM 塩化マグネシウム溶液に溶解したのちバクテリアル

アルカリホスファターゼ (東洋紡、BAP-101) 1ユニットを添加し、65℃下30分の反応を施し脱塩酸化処理を行った。次にこの反応液からフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱により該DNA断片を精製し10 μ lの水に溶解した。

上記の様に調製したpKCRベクターのDNA断片0.01 μ gと前述の平滑末端化されたhHGF cDNAのBamHI断片0.1 μ gを含む反応液 (66 mM トリス-塩酸 pH 7.6、6.6 mM 塩化マグネシウム 10 mM ジチオスレイトール、66 μ M ATP) 20 μ l 中にて14℃で12時間T4 DNAリガーゼ (東洋紡 LGA-101) による結合反応を行った。このT4 DNAリガーゼ反応液10 μ lを用いて大腸菌HB101株 (宝酒造) を説明書に従い形質転換し、アンピシリンを50 μ g/mlの濃度で含む培地上で培養することにより数十個のアンピシリン耐性株を得た。

これらの組換え体をManiatisらの方法 (「モレキュラー・クローニング」、コールド・ス

ブリング・ハーバー・ラボラトリ、86頁～96頁(1982))に従い解析することにより、発現ベクターpKCRのプロモーターとポリアデニレーション部位の中間に存在する制限酵素Sma I切断部位にhHGF遺伝子が順方向に二連結したプラスミド、pKCRHGF-2プラスミドを得ることが出来た。

その構造を第4図に示す。

(II) hHGF蛋白質を遺伝的に発現する細胞株の取得

実施例1-(I)により作製された発現ベクターpKCR(プロシーディング・アンド・ナチュラール・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Nat. Acad. Sci.) 78巻(2) 1527頁(1981))の制限酵素Bam HI切断部位にhHGF cDNAが二重挿入されたプラスミドpKCRHGF-2をManiatisらの方法(「モレキュラー・クローニング」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ、86頁～96頁(1982))に従い組換え体の大腸菌から回収、精製しHGF発現プラスミドDNA

を大量に得た。

一方形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミドpSV2neo(ジャーナル・オブ・アプライド・ジェネティクス(Journal of Applied Genetics) 1巻327頁(1982))を有する組換え体の大腸菌およびpAd-D26-1(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of molecular biology) 第159巻601頁(1982))を有する組換え体の大腸菌から前述のManiatisらの方法に従い該プラスミドDNAを回収、精製した。

得られた三種のプラスミドDNAを用いてAusubelらの方法(カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー(Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス(Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) 9・1・1章～9・1・4章(1987))を基にCHO細胞に二重形質転換してCHO細胞を形質転換した。

即ち、まず直径9cmのシャーレの中でFCS(牛胎児血清)が10%入ったERDF培地(橋本製薬社製)中でCHO細胞をセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除きそこにDNA溶液を滴加するが、該DNA溶液は予め次に示す手順に従って調製した。

まず直径9cmのシャーレー一枚につき300μlの2×HEBS溶液(2×HEBS溶液: 1.6%塩化ナトリウム、0.074%塩化カリウム、0.05%磷酸水素二ナトリウム12水塩、0.2%デキストロース、1%HEPES(pH7.05))と10μgのプラスミドDNAおよび1μgのpSV2neoプラスミドDNA、1μgのpAd-D26-1プラスミドDNAを加え、滅菌された水で570μlに合わせた溶液をエッペンドルフ遠心管中に準備する。次に該DNA溶液に30μl

の2.5Mの塩化カルシウム溶液を滴加しながらボルテックスミキサーを用い数秒間激しく混和する。これを室温で30分間放置するが、その間およそ10分おきにボルテックスミキサーで混和する。

この様にしてできたDNA溶液を前述の細胞にかけて室温で30分間静置した。その後FCSが10%入ったERDF培地9mlをシャーレに入れて、5%CO₂存在下、37℃で4～5時間培養した。次にシャーレから培地を除き5mlの1×TBS++溶液(1×TBS++溶液: 25mMトリス-塩酸(pH7.5)、140mM塩化ナトリウム、5mM塩化カリウム、0.6mM磷酸水素二ナトリウム、0.08mM塩化カルシウム、0.08mM塩化マグネシウム)で細胞を洗浄し、1×TBS++溶液を除きした後、グリセロールを20%含む1×TBS++溶液5mlを、細胞にかけて、室温で1～2分間静置し、上清を除去した。その後5mlの1×TBS++溶液で細胞を再び洗浄し、FCSが10%入ったERDF培地

10 ml をシャーレに入れて5% CO₂ 存在下、37℃で培養した。培養後、48時間が経過した時点で培地を除き、5 ml の1×TBS++溶液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA 溶液(シグマ社) 2 ml をかけ、室温で30秒静置した。その後、トリプシン-EDTA 溶液を除き、それから5分後にFCSが10%入ったERDF 培地10 ml をシャーレに入れて細胞を割がし、9 cm シャーレ一枚分の細胞を9 cm シャーレ10枚に分けて薬剤G418 (G418 硫酸塩 (GENETICIN); GIBCO 社) を200 μg/ml の濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日が経過した時点で生き残ったG418 に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおよそ3.1 cm² の24穴の培養皿を用い、それぞれFCSが10%入ったERDF 培地1 ml 中でおよそ7日間培養し直した。

以上の細胞の培地をFCSを含まないERDF 培地に代えて培養を続け72時間が経過した細胞の培地を個別に2 ml 量め、それをセントリコン

濃縮器(ミリポア社)で50 μl に遠心濃縮してそのうちの約15 μl をサンプルとして、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従いウエスタンブロット法で解析しhHGF 蛋白質の発現を確認した。

また、Gohda らの方法(Experiments in Cell Research) 166巻139頁~150頁(1986))によりhHGF 活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

さらに得られた細胞株は個別に単離され酵素イムノアッセイ法を行いhHGF 蛋白質の定量を行った。

その結果、発現量の確認された細胞株B-1、B-27、B-102を得た。

実施例2

(1) hHGF 遺伝子を有する発現ベクターを用いて繰り返し形質転換して得られる、hHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株の取得
実施例1-(1)により取得した、hHGF 遺

伝子発現ベクターpKCRHGF-2 及びミコフエノール耐性の形質転換細胞選択用のマーカーをコードするプラスミドpMBG (Nature 294, 228 (1981)) を有する組換え体の大腸菌から、前述のManiatis らの方法に従い該プラスミドDNA を回収、精製した。

得られた二種のプラスミドDNA を用いてAusubel らの方法(カレント・プロトコール・イン・モレキュラー・バイオロジー (Current Protocols in Molecular Biology)、グリーン・パブリッシング・アソシエーツ・アンド・ウイリー・インターサイエンス (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience) 9.1.1 章~9.1.4 章(1987)) を基に、実施例1-(1)によって得られたhHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株のうち、hHGF の発現量の多いもの3株(B-1、B-27、B-102)を単離し、それらを個別に二重形質転換して該細

胞を形質転換した。

すなわち、まず直径9 cm シャーレの中でFCSが10%入ったERDF 培地中で、前述のhHGF 蛋白質を継代的に発現する細胞株を個別にセミコンフルエントな状態になるまで培養した。次にシャーレから培地を除きそこにDNA 溶液を滴加するが、該DNA 溶液は、10 μg のpKCRHGF-2 プラスミドDNA 及び1 μg のpMBG プラスミドDNA を用いる以外は、実施例1-(1)と同様の手順で調製した。

この様にしてできたDNA 溶液を前述の細胞にかけて室温で30分間静置した。その後FCSが10%入ったERDF 培地9 ml をシャーレに入れて、5% CO₂ 存在下、37℃で4~5日間培養した。次にシャーレから培地を除き5 ml の1×TBS++溶液(前述)で細胞を洗浄し、1×TBS++溶液を除いた後、グリセロールを20%含む1×TBS++溶液5 ml を細胞にかけて、室温で1~2分間静置し、上清を除いた。その後5 ml の1×TBS++溶液で細胞を再び

洗浄し、FCSが10%入ったERDF培地10 mlをシャーレに入れて5%CO₂存在下、37℃で培養し、48時間が経過した時点で培地を除き、5 mlの1×TBS-+溶液で細胞を洗浄した後、細胞にトリプシン-EDTA溶液(シグマ社)2 mlをかけ、室温で30秒静置した。その後、トリプシン-EDTA溶液を除き、それから5分後にFCSが10%入ったα-MEM(-)培地10 mlをシャーレに入れて細胞を制がし、9 cmシャーレー一枚の細胞を9 cmシャーレ10枚に分けて薬剤ミコフェノール酸(シグマ社製)を1 μg/ml及びキサンチン(シグマ社製)を250 μg/mlの濃度になるように加えて培養を続けた。その後10日が経過した時点で生き残ったミコフェノール酸に耐性の細胞を単離し、一つの培養用の穴がおよそ3.1 cm²の24穴の培養皿を用い、それぞれFCSが10%入ったERDF培地1 ml中でおおよそ7日間培養し直した。

以上の細胞の培地をFCSを含まないERDF培地に代えて培養を続け72時間が経過した細胞

の培地を個別に2 ml集め、それらをセントリコン濃縮器(ミリポア社)で50 μlに遠心濃縮してそのうち約15 μlをサンプルとしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。

これを常法に従うエスタンプロット法で解析しhHGF蛋白質の発現を確認した。

また、Gohdaらの方法(エクスペリメンタル・セル・リサーチ(Experimental Cell Research)166巻139頁~150頁(1986))によりhHGF活性を測定し生物学的活性の存在を確認した。

その結果を第5図に示す。

さらに、得られた細胞株のうちいくつかを個別に単離し酵素イムノアッセイ法でhHGF蛋白質の発現量を確認した結果、二重形質転換前の細胞株B-102の発現量のおよそ20倍の発現量を示す細胞株BD-24を得た。

実施例3

実施例2で得たhHGF産生株BD-24を10%FCSを含むERDF培地(板東製薬製)で

培養し、その培養上清液500 mlを得た。これを10 mlのS-Sepharose Fast Flow®(ファルマシア社)を充填したカラムに吸着させた後、10 mMリン酸ナトリウムを含むpH7.5の緩衝液中の塩化ナトリウム濃度を上昇させることにより吸着蛋白質を溶出させた。組換えhHGF蛋白質は塩化ナトリウム濃度が約0.7モルの百分に溶出した。このhHGF百分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析したところ、非還元条件下では、分子量約76,000~92,000にブロードなバンドを与えたのみであり、還元条件下では、約60,000~65,000にブロードなバンドを、分子量約56,000により弱いバンドを与え(これらはhHGF蛋白質のH鎖に相当する)、さらに分子量約32,000~35,000に2本のバンドを与えた(これらはhHGF蛋白質のL鎖に相当する)。こうしたバンドの多重性及びブロードさは、hHGF蛋白質に付加した糖鎖の不均一性によって生ずるものである。

この精製hHGF蛋白質溶液の緩衝液を0.1モルの重炭酸アンモニウム水溶液に置換したのち、hHGF蛋白質量の1/50量のスタフィロコッカス・オーレウス(*Staphylococcus Aureus*) V8プロテアーゼ(マイルス・ラボラトリー社製)を加えて、37℃で一晩インキュベートしてペプチド混合物に分解した。この混合物溶液をC8カラム(ペーカーボンド社製、4.6×250 mm)を装着した逆相高速液体クロマトグラフィーによって、アセトニトリル濃度を0%から60%に変化させ(1%/分)で、分離した。溶出した約10個のペプチドピークについて、アミノ酸組成分析を行ったところ、約18分の位置に溶出したペプチドのアミノ酸組成は、表1のようであった。この組成は、hHGFをコードするcDNAの塩基配列から推測されたアミノ酸配列のうち、読み出しのメチオニンから数えて32番目のグルタミンから始まり41番目のグルタミン酸で終わるペプチドの理論組成とは一致した。

表 1 ペプチドのアミノ酸組成比

アミノ酸	組 成 比
アスパラギン酸/アスパラギン	1.22
スレオニン	0.63
グルタミン酸/グルタミン	2.03
イソロイシン	0.99
リジン	0.92
ヒスチジン	0.65
アルギニン	3.11

このペプチドをファスト・アトム・ボンバードメント・マスマスベクトロスコーピー（日本電子製HX-100）によって質量分析したところ、分子量1321の位置にピークが得られ、このペプチドの分子量は1320であると決定された。32番目のグルタミンから41番目のグルタミン酸に至るペプチドの理論分子量は1337であることから、アミノ末端のグルタミンが脱アンモニウムしてピログルタミン酸に変化したものと結論するこ

表わす。

第3図は、ヒト肝実質細胞増殖因子を発現するベクターを構築する工程を表わす。

第4図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードするDNAを有する発現ベクターの構造を表わす。

第5図は、本発明のヒト肝実質細胞増殖因子をコードするDNAを有する発現ベクターを有するCHO細胞が産生するヒト肝実質細胞増殖因子を含む培養上清の生物学的活性を示したものである。

とが出来る。即ち、分泌されたhHGF蛋白質のN末端アミノ酸は32番目のグルタミンが修飾されて生成したピログルタミン酸であることが分かった。

（発明の効果）

本発明に係わるhHGF遺伝子を挿入された発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、今まで困難であった生物学的活性を有するhHGF蛋白質を大量、安定かつ容易に発現することが可能となり、その結果、N末端がピログルタミン酸に修飾された本発明のhHGF蛋白質を精製・取得し得るようになった。

4 図面の簡単な説明

第1図はヒト肝実質細胞増殖因子をコードする遺伝子の塩基配列を表わす。

第2図はヒト肝実質細胞増殖因子のアミノ酸配列を示す。

配列中、第1番目～第31番目（—）はシグナルペプチドを表わし、Zは修飾される前がGlnを表わし、修飾された後はピログルタミン酸を

出願人 三菱化成株式会社
代理人 井理士 長谷川 一
(ほか1名)

第 1 図 (10)

ATG TGG GTG ACC AAA CTC CTG CCA GCC CTG CTG CAG CAT GTC CTC CTG CAT CTC CTC⁶⁰
 CTG CTC CCC ATC GCC ATC CCC TAT GCA GAG GGA CAA AGG AAA AGA AGA AAT ACA ATT CAT¹²⁰
 GAA TTC AAA AAA TCA GCA AAG ACT ACC CTA ATC AAA ATA GAT CCA GCA CTG AAG ATA AAA¹⁸⁰
 Eco RI ACC AAA AAA GTG AAT ACT GCA GAC CAA TGT GCT AAT AGA TGT ACT AGG AAT AAA GGA CTT²⁴⁰
 CCA TTC ACT TGC AAG GCT TTT GTT TTT GAT AAA GCA AGA AAA CAA TGC CTC TGG TTC CCC³⁰⁰
 TTC AAT AGC ATG TCA AGT GGA GTG AAA AAA GAA TTT GGC CAT GAA TTT GAC CTC TAT GAA³⁶⁰
 AAC AAA GAC TAC ATT AGA AAC TGC ATC ATT GGT AAA GGA CGC AGC TAC AAG GGA ACA GTA⁴²⁰
 TCT ATC ACT AAG AGT GGC ATC AAA TGT CAG CCC TGG AGT TCC ATG ATA CCA CAC GAA CAC⁴⁸⁰
 AGC TTT TTG CCT TCG AGC TAT CGG GGT AAA GAC CTA CAG GAA AAC TAC TGT CGA AAT CCT⁵⁴⁰
 CGA GGG GAA GAA GGG GGA CCC TGG TGT TTC ACA AGC AAT CCA GAG GTA CGC TAC GAA GTC⁶⁰⁰
 TGT GAC ATT CCT CAG TGT TCA GAA GTT GAA TGC ATG ACC TGC AAT GGG GAG AGT TAT CGA⁶⁶⁰
 GGT CTC ATG GAT CAT ACA GAA TCA GGC AAG ATT TGT CAG CGC TGG GAT CAT CAG ACA CCA⁷²⁰
 CAC CGG CAC AAA TTC TTG CCT GAA AGA TAT CCC GAC AAG GGC TTT GAT GAT AAT TAT TGC⁷⁸⁰

第 1 図 (102)

CGC AAT CCC GAT GGC CAG CCG AGG CCA TGG TGC TAT ACT CTT GAC CCT CAC ACC CGC TGG⁸⁴⁰
 GAG TAC TGT GCA ATT AAA ACA TGC GCT GAC AAT ACT ATG AAT GAC ACT GAT GTT CCT TTG⁹⁰⁰
 GAA ACA ACT GAA TGC ATC CAA GGT CAA GGA GAA GGC TAC AGG GGC ACT GTC AAT ACC ATT⁹⁶⁰
 TGG AAT GGA ATT CCA TGT CAG CGT TGG GAT TCT CAG TAT CCT CAC GAG CAT GAC ATG ACT¹⁰²⁰
 CCT GAA AAT TTC AAG TGC AAG GAC CTA CGA GAA AAT TAC TGC CGA AAT CCA GAT GGG TCT¹⁰⁸⁰
 GAA TCA CCC TGG TGT TTT ACC ACT GAT CCA AAC ATC CGA GTT GGC TAC TGC TCC CAA ATT¹¹⁴⁰
 CCA AAC TGT GAT ATG TCA CAT GGA CAA GAT TGT TAT CGT GGG AAT GGC AAA AAT TAT ATG¹²⁰⁰
 GGC AAC TTA TCC CAA ACA AGA TCT GGA CTA ACA TGT TCA ATG TGG GAC AAG AAC ATG GAA¹²⁶⁰
 GAC TTA CAT CGT CAT ATC TTC TGG GAA CCA GAT GCA AGT AAG CTG AAT GAG AAT TAC TGC¹³²⁰
 CGA AAT CCA GAT GAT GAT GCT CAT GGA CCC TGG TGC TAC ACG GGA AAT CCA CTC ATT CCT¹³⁸⁰
 TGG GAT TAT TGC CCT ATT TCT CGT TGT GAA GGT GAT ACC ACA CCT ACA ATA GTC AAT TTA¹⁴⁴⁰
 GAC CAT CCC GTA ATA TCT TGT GCC AAA ACG AAA CAA TTG CGA GTT GTA AAT GGG ATT CCA¹⁵⁰⁰
 ACA CGA ACA AAC ATA GGA TGG ATG GTT AGT TTG AGA TAC AGA AAT AAA CAT ATC TGC GGA¹⁵⁶⁰
 GGA TCA TTG ATA AAG GAG AGT TGG GTT CTT ACT GCA CGA CAG TGT TTC CCT TCT CGA GAC¹⁶²⁰
 Xho I

第 1 図 (103)

TTG AAA GAT TAT GAA GGT TGG CTT GGA ATT CAT GAT GTC CAC GGA AGA GGA GAT GAG AAA¹⁶⁸⁰
 Eco RI
 TGC AAA CAG GTT CTC AAT GTT TCC CAG CTG GTA TAT GGC CCT GAA GGA TCA GAT CTG GTT¹⁷⁴⁰
 TTA ATG AAG CTT GCC AGG CCT GGT GTC CTG GAT GAT TTT GTT AGT ACG ATT GAT TTA CCT¹⁸⁰⁰
 AAT TAT GSA TGC ACA ATT CCT GAA AAG ACC AGT TGC AGT GTT TAT GGC TGG GGC TAC ACT¹⁸⁶⁰
 GGA TTG ATC AAC TAT GAT GGC CTA TTA CGA GTG GCA CAT CTC TAT ATA ATG GGA AAT GAG¹⁹²⁰
 AAA TGC AGC CAG CAT CAT CGA GGG AAG GTG ACT CTG AAT GAG TCT GAA ATA TGT GCT GGG¹⁹⁸⁰
 GCT GAA AAG ATT GSA TCA GGA CCA TGT GAG GGG GAT TAT GGT GGC CCA CTT GTT TGT GAG²⁰⁴⁰
 CAA CAT AAA ATG AGA ATG GTT CTT GGT GTC ATT GTT CCT GGT CGT GGA TGT GCC ATT CCA²¹⁰⁰
 AAT CGT CCT GGT ATT TTT GTC CGA GTA GCA TAT TAT GCA AAA TGG ATA CAC AAA ATT ATT²¹⁶⁰
 TTA ACA TAT AAG GTA CCA CAG TCA TAG
 Kpn I

第 2 図 (101)

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu
 Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu Leu
 Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu
 Gly Z Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His
 Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu
 Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys
 Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys
 Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu
 Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp
 Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro
 Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys
 Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu
 Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile
 Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val
 Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln
 Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His
 Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys
 Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro
 Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe

第 2 図 (102)

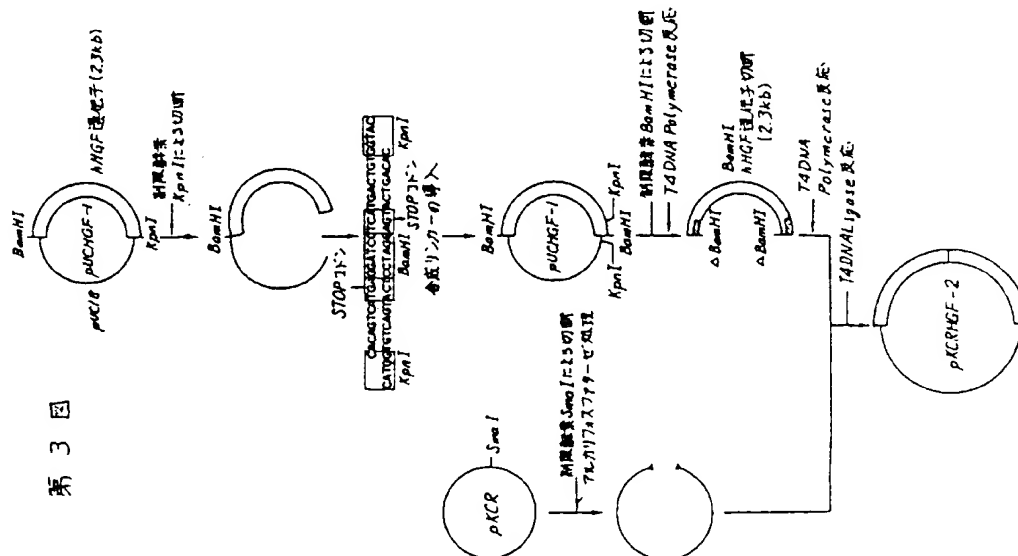
Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val
 Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu
 Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg
 Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys
 Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro
 His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr
 Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp
 Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp
 Glu Tyr Cys Ala Tyr Lys Thr Cys Ala Asp
 Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu
 Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly
 Ile Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile
 Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp
 Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr
 Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser
 Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro
 Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile

第2図(1の3)

Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp
 Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met
 Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu
 Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro
 Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys
 Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro
 Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro
 Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu
 Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu
 Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr
 Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile Pro
 Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser
 Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly
 Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu
 Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp
 Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile
 His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys
 Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu

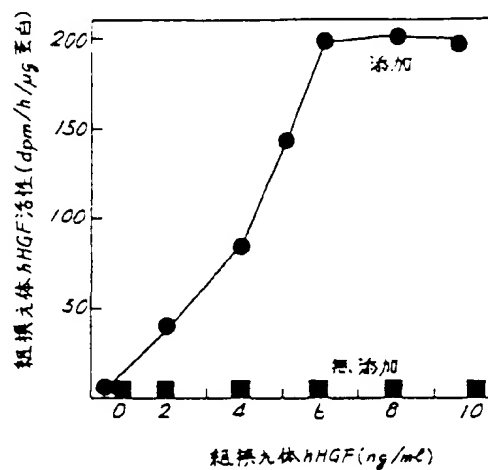
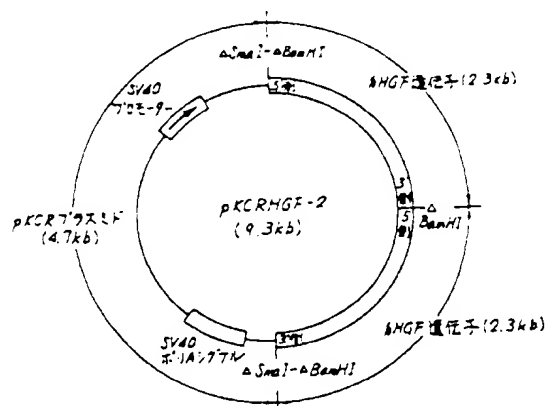
第2図(1の4)

Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val
 Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu
 Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro
 Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr
 Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr
 Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg
 Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu
 Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val
 Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly
 Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu
 Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu
 Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val
 Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro
 Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala
 Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile
 Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser *



第 5 図

第 5 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

// A 61 K 37/02
C 12 N 15/16

ACS
ZNA

8317-4C

⑫発 明 者 石 井 健 久

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内

⑫発 明 者 高 橋 和 展

神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成株式会社
総合研究所内